KISEP Head and Neck Korean J Otolaryngol 2005;48:788-95

간세포성장인자가 하인두 편평세포암 세포주에서 Matrix Metalloproteinase(MMP)-2, 9과 Urokinase Type Plasmogen Activator에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 이비인후과교실,[1] 생화학교실,[2] 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실[3]
김철호[1] · 문성균[1] · 배준호[1] · 이재호[2] · 최은창[3]

Effect of HGF in Invasion of Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cell Line

Chul-Ho Kim, MD[1], Sung-Kyun Moon, MD[1], JunHo Bae, MD[1], JaeHo Lee, MD[2] and Eun Chang Choi, MD[3]
[1]Department of Otolaryngology and [2]Biochemistry, Ajou University School of Medicine, Seoul; and [3]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Recent reports revealed that hepatocyte growth factor (HGF) is related to tumor invasion and metastasis. Activation of the urokinase-type plasminogen activator (u-PA)/plasmin proteolytic network and matrix metalloproteinase has been shown to play a key role in tumor invasion and dissemination of various malignancies. So we examined the effect of HGF/c-Met on MMP-2, 9 and u-PA in FaDu cell, a hypopharyngeal squamous cell carcinoma cell line. **Materials and Method** : We performed RT-PCR and Western blot in FaDu. Tumor cell invasiveness was assessed by the membrane invasion assay (using Transwell chamber). To examine the role of MMP-2, 9 and the relation between HGF and MMP in the invasion of hypopharyngeal cancer, RT-PCR and zymography were performed in FaDu cells. We tested to confirm the HGF-mediated plasmin activation. **Results** : The expressions of c-Met mRNA and protein were detected in the hypopharyngeal cell line while that of HGF was not. HGF markedly enhanced the invasion of cancer cells in a Transwell invasion chamber in a dose-dependent manner ($p<0.05$). The expression of MMP was detected in hypopharyngeal cancer cells and exogenous HGF slightly enhanced the induction of MMP-2 activity in zymogram analysis. The activity of u-PA was detected in FaDu and HGF (above 10 units/mL) enhanced the activity of u-PA ($p<0.05$). **Conclusion** : These results suggest that HGF may play an important role in hypopharyngeal cancer through the activation of u-PA and matrix metalloproteinase. **(Korean J Otolaryngol 2005;48:788-95)**

KEY WORDS : Hepatocyte growth factor · c-Met, Hypopharyngeal cancer · Invasion · Urokinase-type plasminogen activator · Matrix metalloproteinase.

서 론

원발세포에서 시작된 암세포가 원격전이에 이르기까지는 여러가지 복잡한 단계를 거치게 되는데 먼저 암세포가 주변조직으로 침습하기 위해서는 세포간의 결합이 소실되어야 하고 암세포가 이동하기 위해서는 기저막을 녹이고 주변의 세포외 기질에 붙게 되고 세포외 기질의 단백분해에 의해 주변조직의 결손이 생기면 이를 통해 이동하게 된다. 또한 림프절이나 혈관으로 전이하기 위해서는 신생혈관이 필요하다. 그런데 암세포가 성장하여 주변조직을 침투하고 전이하는 일련의 과정은 복잡하고 다양한 과정을 거쳐 진행되므로 각 과정에서 중요한 역할을 하는 물질들과 이들을 조절하는 인자들의 상호관계에 의해 이루어진다.[1)] 이러한 과정의 초기단계인 기저막 분해와 기질의 단백분해기에서는 matrix metalloproteinase(MMP)와 serine protease가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. MMP는 정상인에서도 상처치유, 임신과 태아발생과 같은 생리적 작용에 관여하고, 관절염과 다발성 경화성 등의 비종양성 질

논문접수일 : 2004년 11월 2일 / 심사완료일 : 2005년 1월 4일
교신저자 : 문성균, 442-721 경기도 수원시 팔달구 원천동 산5
아주대학교 의과대학 이비인후과교실
전화 : (031) 219-5267 · 전송 : (031) 219-5264
E-mail : smoon@ajou.ac.kr

환에도 관여하며 암전이시 세포외 기질의 단백분해에 중요한 역할을 하는것으로 알려져 있고[2] serine protease중에는 urokinase-type plasmogen activator(u-PA)가 암의 침습에 관여하는 것으로 알려져 있다.[3)4)]

한편 기질의 섬유아세포에서 분비되어 종양세포의 성장과 이동을 촉진하고 혈관형성에 관여하는 인자로 알려진[5] 간세포성장인자(hepatocyte growth factor, 이하 HGF)는 간세포뿐만아니라 위장관 상피세포, 각질세포 등을 위시한 여러 상피세포의 증식을 촉진하는 능력이 있음이 알려졌으며, 일부 암세포에 있어서는 protease의 분비를 통해 종양의 활동(motility)과 침습(invasiveness)를 일으키고 형질생성(morphogenesis)과 신생혈관의 생성(angiogenesis)에 관여한다고 알려지게 되었다.[6)7)]

최근 연구에 의하면 몇몇 암의 세포주를 이용한 실험에서 종양의 침습에 중요한 역할을 하는 MMP와 u-PA에 HGF와 c-Met이 관여하는 것으로 보고되면서 이에 대한 연관성과 신호전달물질에 대한 연구가 진행되고 있다.[8)9)] 따라서 저자들은 두경부 종양에서 침습성이 가장 강하고 전이를 잘하는 종양인 하인두암의 세포주를 이용하여 HGF/c-Met가 세포의 침습에 미치는 영향을 알아보고 MMP와 u-PA의 발현에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 한다.

재료 및 방법

세포배양

American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 구입한 하인두암 세포주 FaDu(HTB-43, ATCC)를 EMEM (10% FBS) 배지에서 5% CO2, 37℃에서 배양하였다. u-PA assay를 위해 비교실험을 위해 Madin-Darby canine kidney(MDCK-2) 세포주를 10% FBS가 포함된 DMEM에 배양하여 이용하였다.

실험에 사용한 항체

HGF에 대한 일차항체는 human 항 HGF affinity purified polyclonal goat antibody(R & D systems, Inc, MN, USA)를 사용하였고 c-Met에 대한 일차 항체는 human 항 HGF receptor(c-Met) polyclonal goat antibody(R & D system)를 사용하였다.

RT-PCR에 의한 HGF와 c-Met의 mRNA 측정

하인두암 세포주 1 mL의 TRIzol®(GIBCOBRL, Grand Island, NY, USA) 시약에 균질화시킨 후, 총 RNA를 추출하였다. 하인두암 세포주에서 추출된 총 RNA 2 μg을 각각 Omniscript Reverse Transcriptase kit(20511, Qiagen Germany)의 반응혼합물{10X Buffer RT 2.0 μL, dNTP Mix(5 mM each dNTP) 2.0 μL, Oligo-dT primer(10 μM) 2.0 μL, RNase inhibitor(10 units/μL) 1.0 μL, Omniscript Reverse Transcriptase 2 units, RNase-free water} 20 μL에 넣고 37℃에서 60분, 94℃에서 5분간 역전사하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 Minicycler™(MJ research, USA)를 사용하였고 합성된 cDNA를 Taq DNA polymerase 1 unit(Roche Diagnostics Co, Indianapolis, USA)과 각각의 primer를 넣어 증폭시켰다. 이 실험에서 사용된 human HGF primer와 human c-Met primer의 염기배열 순서는 다음과 같다.

human HGF ;
sense : 5 '- ACA TCG TCA CTT CTG GC - 3 '
antisense : 5 '- ATC CAT CCT ATG TTT GTT CG - 3 '
human c-Met ;
sense : 5 '- AGT AGC CTG ATT GTG CAT TT - 3 ',
antisense : 5 '- TCT TTC ATG ATG CCC TC - 3 '.
β-Actin ;
sense : 5 ' - TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC TT - 3 ',
antisense : 5 '- CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG - 3 '.

PCR과정은 초기 변성을 96℃에서 3분간 실시한 후, 96℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간을 총 30 cycles을 실시하고 신전(extension)은 72℃에서 5분간 시행하였다.

Western blotting을 이용한 c-Met의 발현 검색

하인두암 세포주를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 다음 단백질분해 억제제(100 μg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/mL leupeptin)가 첨가된 RIPA (RadioImmunoPrecipitation) buffer 1 mL{150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris(pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5% Deoxycholate}에 넣고 균질화하였다. 이 균질액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 Western blot analysis에 이용하였는데 단백질의 양은 Bio-Rad protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 이용하여 측정하였다. Well 당 20 μg의 단백질을 분리하기 위해 sodium dodesyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 사용하여 분리한 후 nitrocellulose filter(Amer-

sham, Arlington Heights, IL. USA)에 옮긴 다음 4℃에서 하루 밤 동안 항 c-Met항체를 반응시켰다. 다음날 filter를 0.1% Tween-20이 함유된 Tris buffered saline(TBS) 용액으로 세척한 후 peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody(Amersham)와 donkey anti-mouse antibody(Amersham)로 각각 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection system(ECL, Amersham)을 이용하여 X-ray film으로 확인하였다.

HGF 투여 후 종양세포의 침습성 분석

HGF의 투여에 의해 실제 침습성 정도가 달라지는지를 확인하기 위해 Transwell chamber(Costar)를 사용하였다. 먼저 polyethylene filter(8 μm pore-sized)의 윗면에 EMEM 100 μL에 녹인 type I collagen(6 μg/filter)을 부은 후 하루밤 동안 laminar flow hood에서 coating시켰다. 하부 well에 0.5% FBS medium 500 μL를 넣은 후 HGF 0, 10, 30 ng/μL의 농도로 처리한 well을 각각 만들었다. Mitomycin C(8 μg/mL)를 30분간 전처리 한 뒤 상부 well의 filter위에 10^5 cells(in 100 μL of growth medium)를 부착하였다(Fig. 2). 이 chamber를 37℃, 5% CO_2에서 48시간 배양한 다음 상부 well의 filter를 제거하고 pore를 통과하여 아랫면에 부착된 세포를 hematoxylin으로 염색한 후 광학 현미경을 통하여 그 숫자를 세었다.

종양세포에서 matrix metalloproteinase(MMP)-2, 9의 zymogram분석

RT-PCR를 이용한 MMP의 발현도 검사

냉동된 FaDu 세포조직 50~100 mg을 이용하여 조직에서의 mRNA 측정때와 동일한 방법을 이용하였다. 이 실험에서 사용된 MMP-2 primer와 MMP-9 primer의 염기배열 순서는 다음과 같다.

MMP-2;
sense : 5'-ACC TGG ATG CCG TCG TGG AC-3'
antisense : 5'-TGT GGC AGC ACC AGG GCA GC-3'
MMP-9;
sense : 5'-GGG GAA GAT GCT GCT GTT CA-3'
antisense : 5'-GGT CCC AGT GGG GAT TTA CA-3'

PCR과정은 초기 변성을 96℃에서 3분간 실시한 후 96℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간을 총 30 cycles을 실시하고 신전(extension)은 72℃에서 5분간 시행하였다.

Zymogram analysis

하인두암 세포주 세포에 HGF를 0, 10, 30 ng/mL로 처리하고 매 1, 2일 경과 후마다 상층액을 얻었다. 상층액으로부터 단백질을 정량한 뒤 각각 30 μg을 취한 다음 APMA 15 μL씩 첨가하여 37℃에서 1시간동안 활성화시켰다. 활성화된 시료를 넣고 MightySlimTM SX 250(Hoefer, CA, USA)24시간과 48시간 처리한 세포를 갈아 얻어진 세포질 시료를 얻는다. 이들 시료에서 각각 10 μL을 얻어 sample buffer에 넣고 10분간 유지한 후 만들어진 gel에 시료를 넣고 Novex XCell II를 이용하여 4℃에서 125V로 120분간 반응시켰다. 실온에서 60분간 renaturing buffer에서 유지한 다음 developing buffer 100 mL로 교환하여 37℃ fresh developing buffer에서 가볍게 흔들면서 18시간 유지하였다. 그리고나서 3시간 동안 Coomassie blue로 염색한 다음 물로 씻어내고 10분 간격으로 관찰하면서 탈색용액(Methanol 400 mL, Acetic acid 100 mL, Distilled water 500 mL)으로 Gel을 탈색시킨 후 image analyzer로 사진을 얻었다.

종양세포에서 HGF가 Urokinase type Plasmogen activator에 미치는 영향

하인두암 세포주를 10% FBS가 포함된 DMEM 96 well plates에 접종하였다(3000 cells/well, 6000 cells/well)(MDCK-2 세포는 동일한 방법으로 1500 cells/well을 접종하였다. 이러한 plate를 두 set을 준비하여 하나는 plasmin 활성도를 측정하고 다른 하나는 세포의 증식을 측정하도록 준비하였다. 하룻밤동안 배양후에 각 well에 HGF 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 units/ml을 넣고 24시간 배양하였다.

Plasmin 활성도 측정

phenol red가 없는 DMEM에 두번 씻고 reaction buffer 200 μL{50%(v/v) 0.05 U/mL plasminogen in DMEM (without phenol red), 40%(v/v) 50 mM Tris buffer (pH8.2), 10%(v/v) 2.25 mM chromozyme PL in 100 mM glycine solution}을 넣었다. 37℃, 5% CO2 조건하에 3시간 동안 배양한뒤 405 nm의 파장에서 automated spectrophotometric plate reader로 흡광도를 측정하였다.

세포의 증식 측정

4℃, 50% trichloroacetic acid에 20분 정도 고정한 뒤

deionized water에서 5번 세척한 뒤 건조시켰다. sulforodamine B(SRB)(100 μL/well, 0.4%(w/v) in 1% acetic acid)을 각 well에 넣은 뒤 plate을 상온에서 30분 정도 배양하였다. Unbounded SRB을 제거하기 위해 1% acetic acid에 세번 세척한 뒤 570 nm의 파장에서 automated spectrophotometric plate reader로 흡광도를 측정하였다.

통계적 분석

침습분석은 one - way ANOVA test를 이용하였고 사후검정은 Scheffe test를 이용하였다. 통계는 p 값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의의있는 것으로 판정하였다.

결 과

하인두암 세포주에서의 RT - PCR과 Western blotting

하인두암 세포주를 이용한 RT - PCR의 결과 HGF의 발현은 없었으나 c - Met의 발현은 강하게 나타났고 Western blotting상 c - Met의 강한 발현이 확인되었다(Fig. 1).

HGF 투여 후 종양세포의 침습성 분석

Transwell chamber에 type I collagen을 coating하고 시행한 침습 검사에서 대조군이 평균 19개인데 반해 HGF 10 ng/mL인 경우 평균 89개이였고 HGF 30 ng/mL인 경우 136개로 HGF를 처리한 군에서 대조군에 비해 Transwell chamber를 통과한 수가 통계적으로 유의하게 많았고($p< 0.05$), HGF 30 ng/mL인 경우가 10 ng/mL 경우에 비해 통계적으로 유의하게 침습이 증가되는 결과를 보였다(Fig. 3).

종양세포에서 matrix metalloproteinase(MMP) - 2, 9의 zymogram분석

RT-PCR를 이용한 MMP의 발현도 검사

하인두암 세포주에서 HGF가 MMP - 2와 MMP - 9에 미치는 영향을 보기위해 시행한 검사에서 MMP - 2인 경우 HGF를 처리하였을 때 24시간, 48시간에 각각 시행한 RT - PCR 검사상 HGF 10 ng/mL을 처리한 경우에서는 HGF를 처리하지 않은 대조군과 차이가 없었으나 HGF 30 ng/mL으로 처리한 경우에는 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 MMP - 9인 경우에는 대조군과 HGF 처리군과의 차이가 뚜렷하지 않았다(Fig. 4).

Zymogram analysis

MMP - 2, 9의 활성도에 미치는 HGF의 영향을 보기위해 시행한 zymogram상 하인두암 세포주에서 시행한 검사에서는 MMP의 활성도가 확인되지 않았으나 하인두암 세포주의 배양액에서 시행한 MMP 활성도 검사에서는 MMP - 2의 활성도가 확인되었는데 이는 대조군에 비해 증가된 양상이었고 24시간에 시행한 zymogram에서는 HGF 10 ng/mL를 처리한 경우에 활성도가 가장 크게 나타났으며 48시간에 시행한 zymogram에서는 검사에서는 HGF 30 ng/mL를 처리한 경우에 활성도가 가장 크게 나타났다. MMP - 9의 경우 48시간에 시행한 zymogram에서 HGF 30 ng/mL를 처리한 경우에 활성도가 약하게 발현되었으나 다른 시간과 조건의 검사에서 활성도가 약하여 발현의 차이를 보기가 어려웠다(Fig. 5).

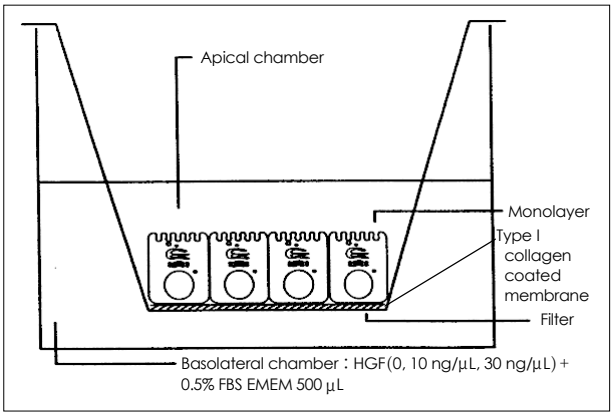

Fig. 2. Transwell chamber used in invasion assay.

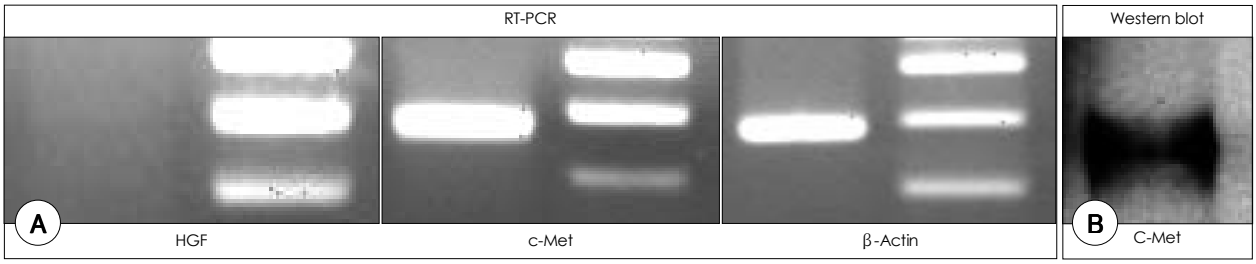

Fig. 1. Expression analysis of c-Met and HGF in FaDu cell line. A : The expression of c-Met mRNA on RT-PCR were detected in hypopharyngeal cancer line (FaDu cells) B : The protein of c-Met on Western blotting were detected in FaDu cells. However, HGF was not detected in the RT-PCR and Western blotting.

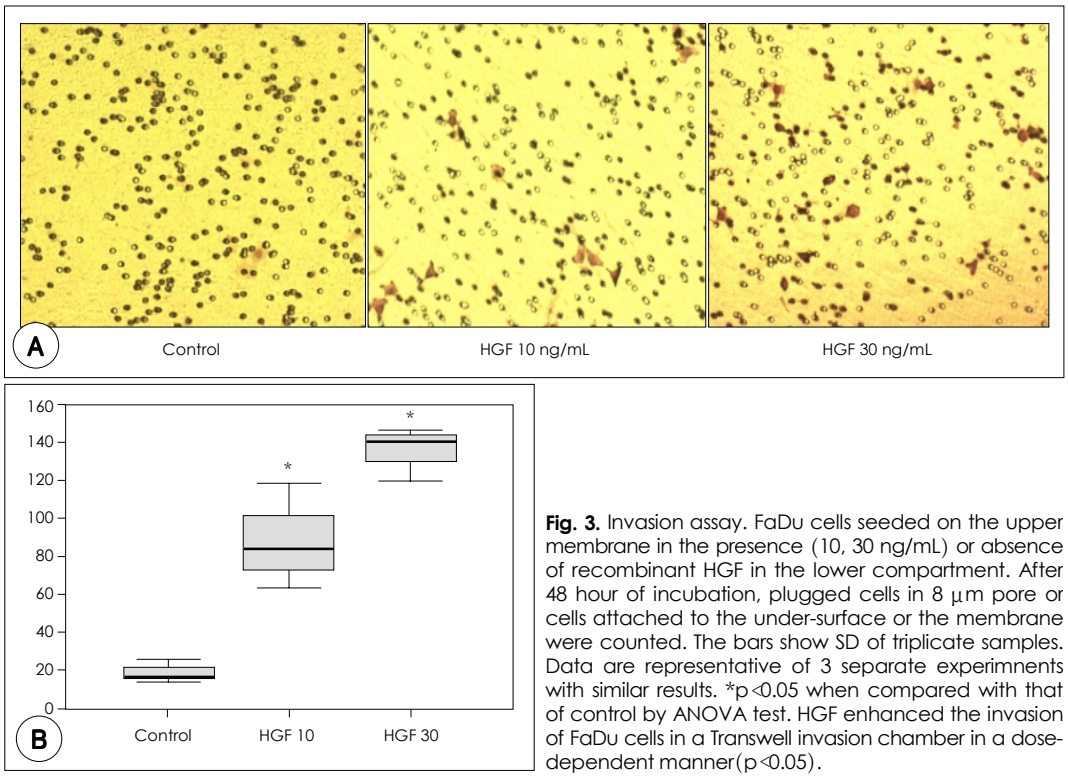

Fig. 3. Invasion assay. FaDu cells seeded on the upper membrane in the presence (10, 30 ng/mL) or absence of recombinant HGF in the lower compartment. After 48 hour of incubation, plugged cells in 8 μm pore or cells attached to the under-surface or the membrane were counted. The bars show SD of triplicate samples. Data are representative of 3 separate experimnents with similar results. *$p<0.05$ when compared with that of control by ANOVA test. HGF enhanced the invasion of FaDu cells in a Transwell invasion chamber in a dose-dependent manner($p<0.05$).

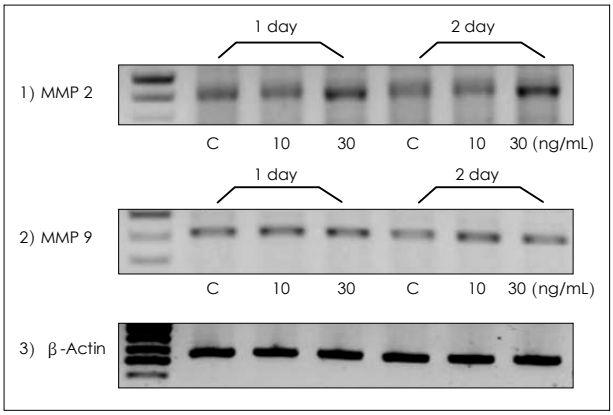

Fig. 4. RT-PCR of MMP-2, 9 in FaDu cells. The expression of MMP was detected in FaDu cells and exogenous HGF (30 ng/mL) slightly enhanced expression of MMP-2.

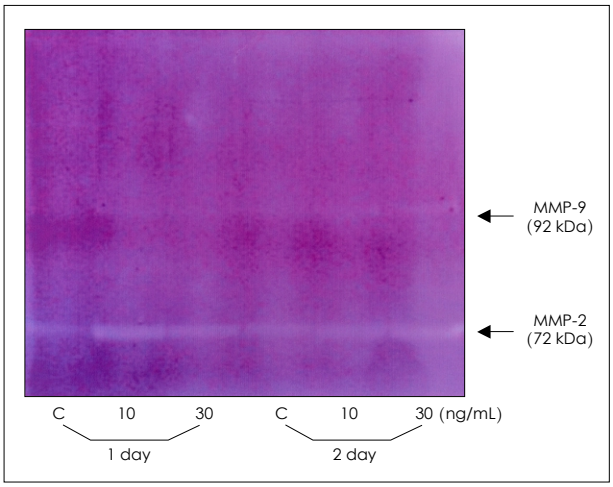

Fig. 5. Induction of MMP-2, 9 activity by HGF. FaDu cells were serum-deprived for 48 hours, then incubated with fresh medium containing HGF (10, 30 ng/mL). Conditioned medium were collected at 24 hours and 48 hours respectively. Samples were fractionated on a polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin and zymogram was developed as described in Material and Methods. Migration of the 92-kDa and 72-kDa gelatinase activities as determined from molecular weight standards are indicated by the solid arrows.

종양세포에서 HGF가 Urokinase type Plasmogen activator에 미치는 영향

하인두암 세포주와 비교하기 위해 사용한 MDCK2세포주에서는 기존의 연구에서와 같이 HGF을 넣었을 경우 넣지 않는군에 비해 통계적으로 유의하게 plasmin 활성도가 증가된 것을 볼 수 있었다(>0.05). 하인두암 세포주에서는 well당 3×10^3개의 세포를 접종한 경우 투여된 HGF의 양에 따라 plasmin의 활성도가 증가된 양상이나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 6). 그러나 well당 6×10^3개의 세포를 접종한 경우에는 HGF의 양에 따라 증가된 양상이었고(Fig. 6A), 이를 SRB 염색에 의해 보정한 결과 HGF 5 unit/ml까지는 변화가 없으나 10 unit/mL에는 5 unit/mL와 통계적으로 유의하게 plasmin의 활성도가 증가된 양상으로

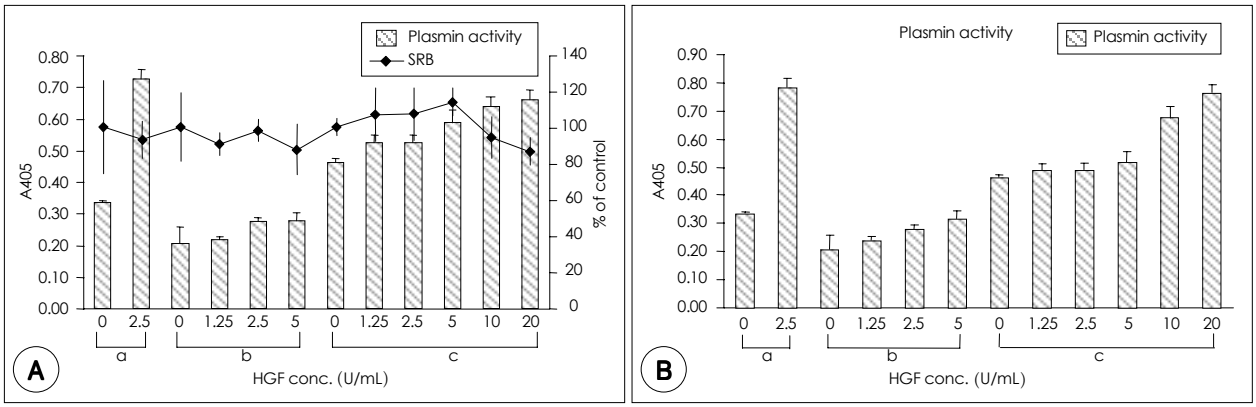

Fig. 6. HGF-mediated plasmin activation in MDCK-2 cells (a) and FaDu (b : 3000 cells/well, c : 6000 cells/well). Plasmin activation was determined by using a specific plasmin chromophore substrate and measuring absorbance at 405 nm as described in "Materials and Methods." A : HGF enhanced the plasmin activation in MDCK-2 cells (a) and FaDu (c) in a dose-dependent manner. B : The resuls of HGF-mediated plasmin activation was corrected by sulforodamine B (SRB) stain. Error bars. The SE from the mean fo multiple experiments (n >3).

나타났다(Fig. 6B).

고 찰

일반적으로 암세포가 주변조직으로 침윤하기 위해서는 우선 세포간의 결합이 소실되어야 하고 암세포가 이동하기 위해서는 주변조직의 분해가 필요하다. 저자들은 이미 하인두암 세포주인 FaDu에서 HGF가 세포간의 해리와 분산을 촉진하고 이동능을 증가시킨다는 보고를 한 바 있다.[10] 그러나 암세포가 주위조직으로 침윤하고 전이현상을 일으키기 위해서는 암 주변 조직의 분해가 필요한데 이에는 MMP와 u-PA 등이 관여하게 된다.[11] 따라서 본 연구는 HGF의 수용체인 c-Met의 발현을 보이는 FaDu에서 MMP와 u-PA의 활성도와 HGF에 의한 MMP와 u-PA의 활성도 증가를 알아보는데 있다. 본 저자들의 연구에서 HGF가 HGF 수용체를 갖고 있는 하인두암 세포주에서 강력한 세포증식과 운동능력을 유발하며 세포의 형태학적인 변형을 초래한다고 보고하였는데 이러한 세포의 운동능력과 형태학적인 변형에 있어서 세포내 액틴과 같은 세포골격의 변형과 상피세포간의 해리현상이 중요하다.[10][12] 일반적으로 Met에 의한 세포의 이동은 두 단계로 나누어 설명하는데 초기 단계는 HGF 처리후 6시간내에 이루어지는 것으로 세포내 골격의 신전(cytoskeletal extension), 퍼짐(spreading), 세포간의 유리(detachment of cell-cell contacts) 등의 현상이 나타나며 후기 단계는 HGF 처리후 16시간 혹은 24시간 이후에 나타나는 현상으로 세포가 분산(scattering)되는 현상이다.[10][13]

이러한 세포의 이동이나 침습에서 가장 중요한 현상은 액틴의 형성이 특정부위에서 일어나 방향성을 지닌 pseudopodia가 돌출하는 것으로 pseudopodia의 형성은 실험적으로 세포의 이동과 관련이 있음이 확인되었고 체내에서 종양세포의 이동과 관련이 있다고 알려져 있다.[14] 이러한 세포의 형태학적인 변화는 저자들의 연구에서도 잘 관찰되었다.[10] 세포간의 유리후에 이동하는 능력을 갖은 세포가 종양이 침습과 전이를 일으키려면 기저막을 파괴한 후 주변 기질을 녹이는 작용을 하게 되는 현상은 일반적으로 종양세포와 주변의 간질세포에서 분비되는 heparinase, serine proteinase, cathepsin, MMP 등에 의해 일어나며 이 중 MMP와 serine protease가 중요한 역할을 하는것으로 알려져 있다.[15] MMP는 기질의 특이성, 억제제의 결합부위, 기질의 결합부위 그리고 세포막에서의 존재 위치에 따라 크게 fibrillar collagen을 분해하는 collagenase, proteoglycan과 glycoprotein을 분해하는 stromelysins, nonfibrillar denatured collagen(gelatin)을 분해하는 gelatinase, 그리고 matrilysin의 4가지 군으로 구분되며 현재까지 24여종 이상의 MMP가 발견되었다.[16][17] 종양의 침습기전은 기저막이 주로 type IV collagen으로 형성되어 있기 때문에 type IV collagenase계의 MMP-2와 MMP-9이 가장 중요한 단백분해 효소로 작용한다.[16] 최근 연구에 의하면 MMP의 작용이 침습과 전이에서의 역할 뿐아니라 proteolytic process에 의한 bioactive molecule 기능을 조절함으로 성장인자를 활성화시키고, 성장인자 결합단백을 불활성화시키고, matrix protein들에서 mitogenic molecule을 release 시키는 역할을 함으로써 암세포 자체의 성장을 유도하고 주위 간질세포들을 간접적으로 조절하여 암세포가 종양을 형성하는데 많은 도움을 주는것이 확인되었다.[18] 또한 cell adhesion molecule을 매개로 하여 암세포의 이동능을 향상시키고, 암세포를 apoptosis와 host immune defense

system으로부터 구제하는 기능을 하며 bFGF나 VEGF 등의 angiogenesis growth factor들을 활성화시키고 endostatin이나 angiostatin등의 natural angiogenesis inhibitor의 생성을 억제함으로써 혈관생성을 용이하게 하는 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.[18] 결과적으로 MMP는 암세포의 성장과 주변 기질 재형성 및 혈관신생 활성화로 암의 생성부터 침윤, 및 전이의 모든 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 하인두암에서의 MMP의 역할을 알아보기 위하여 하인두암 세포와 세포 배양액에서 MMP의 발현과 활성도를 측정하였고 HGF가 MMP의 발현과 활성도에 어떠한 영향을 주는지를 연구하였는데 RT-PCR를 이용한 하인두암 세포에서의 MMP의 발현실험에 있어서 MMP-2와 MMP-9의 발현은 확인이 되었다. 그러나 HGF에 의한 MMP의 발현의 증가는 MMP-2에서 HGF를 30 ng/mL을 처리하였을 때만 발현이 증가되어 고용량의 HGF의 처리시에 mRNA의 발현이 증가되는 것으로 확인되었고, zymography를 이용한 활성도 검사에서 하인두암 세포에서는 MMP-2, 9이 미약하게 발현되어 큰 의미가 없었으나 이를 배양한 배양액에서는 MMP-2가 강하게 발현이 되어 아마도 세포안에서 만들어진 MMP가 배양액으로 분비되는 것으로 추측된다. HGF에 의한 영향도 MMP-2의 경우에는 정상에 비해 HGF를 처리한 군에서 활성도가 증가된 것으로 나타났으나 MMP-9에서는 HGF를 30 ng/mL으로 처리하고 48시간에 측정한 경우에만 약하게 그 활성도가 나타났다. 본 실험에서 MMP-2의 경우는 HGF의 농도에 따른 RT-PCR과 MMP-2의 활성도에서의 일관성이 없어 보이는 결과에 대해서는 실험에 따르는 차이와 다른 실험에서도 드물지 않게 나타나는것이 m-RNA의 증가가 바로 protein의 증가와 연결되지 않을 수 있고 이 실험에서와 같이 분비된 단백질의 활성도는 또 다를수 있지 않을까 하는 것이 저자들의 해석인데 향후 이에 대한 추가 실험과 RT-PCR외에 Western blot도 같이하여 MMP protein의 양의 차이도 측정하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 종양의 종류와 암발생부위간의 차이가 있을 수는 있으나 Horie 등은 HGF/c-met signal의 증폭이 신장암 세포주(renal cell carcinoma cell line, Caki-1)에서 proMMP9, proMMP1, 및 urokinase-type plasminogen activator(uPA)를 upregulation한다고 보고하였고[8] Kawamata 등은 구강 편평세포암종에서 proMMP9과 활성화된 MMP-2가 정상 치주보다 높게 발현되고 종양내의 HGF농도와 MMP의 활성도간에 유의한 상관관계가 있음을 발표하였다.[9] 편평세포암의 세포주를 이용하여 EGF, TGF, HGF가 8시간 후에 MMP-9의 활성도를 유도하였으나 MMP-2는 검사된 48시간 동안에는 유도되지 않았는데 그 후 24시간 이상 incubation한 뒤에 보면 MMP-2의 modest down-regulation이 일어난 현상을 확인하여 사용된 세포에 따라 MMP의 발현과 HGF의 영향이 다름을 알 수 있다.[11] 한편 Trusolino 등은 유방암세포주(human mammary adenocarcinoma cell line)가 MMP-9과 uPA를 기본적으로 많이 분비하는데 여기에 HGF를 처리해도 이로인해 MMP가 더 증가하는 현상은 관찰하지 못했다.[12] 이러한 종양이 발생한 부위에 따라 혹은 세포주의 차이에 따라 기질을 분해하는 단백분해효소의 발현에 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 동일한 하인두암에서도 여러 종류의 세포주를 이용한 검사가 필요하리라 생각된다.

MMP외에 종양의 침습과 전이에 있어 중요한 단백분해효소가 serine protease인데 이는 주로 내피 세포에서 분비되고 tissue-type plasminogen activator(t-PA)와 urokinase-type plasmingen activator(u-PA)가 있으며, 이 중 t-PA는 주로 혈전 용해에 관여하고, u-PA는 주로 암종의 침윤에 관여하는것으로 보고되고 있다[19][20] u-PA는 분자량 52kD인 serine protease의 일종으로 고형암에서 발현이 증가되어 기저막 분해의 중추적인 역할을 담당한다. 종양세포는 u-PA를 비활성화 형태의 proenzyme인 pro-uPA로 합성분비하며 이는 plasmin 등에 의하여 활성화 형태로 전환된다.[21] 활성화된 u-PA는 plasminogen에서 plasmin으로 전환을 더욱 가중시키며, 증가된 plasmin은 종양 주위의 기질을 구성하고 있는 fibrin, fibronetin, proteoglycan, laminin등을 파괴하고, type IV collagenase를 활성화하여 기저막의 중요구성성분인 type IV collagen를 간접적으로 파괴시킨다.[21]

최근 인체 종양조직에서 u-PA의 발현이 예후인자로서의 이용 가능성이 제시되고 있으며, ELISA(enzyme-linked immunoabsorbent assay)법에 의하여 검색된 u-PA의 면역활성능(immunoreactivity)은 고형암에서의 예후인자로 제시되었다.[22] 국내에서는 진 등[23]이 면역조직화학적 염색을 통해 후두 편평세포암종에서 침윤양상과 림프절전이에 따른 MMP-2와 u-PA의 발현양상을 보고하였는데 MMP-2의 경우 림프절전이시 통계적으로 유의하게 발현율이 증가된 양상을 보였고 u-PA의 경우 종양병기(T stage)에 따라 발현율의 차이를 보였다. 본 연구에서는 HGF에 의한 FaDu의 Transwell chamber에서의 침습성을 설명하기에 MMP의 역할만으로는 부족하다는 판단하에 HGF가 u-PA에 미치는 영향을 평가하였는데 진 등[23]의 연구에서 종양의 침습과 전이에 MMP-2가 주 역할을 했다면 본 연구에서 FaDu의 침습에는 MMP와 u-PA가 함께 역할을 했고 이러한 현

상이 HGF에 의해 증가된것으로 판단된다.

결 론

이 연구를 통하여 HGF가 하인두암 세포주(FaDu)의 침습을 증가시키는것으로 확인되었고 이에는 MMP - 2와 u - PA가 역할을 하고 HGF가 MMP - 2와 u - PA의 역할을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서 하인두암의 전이에 있어 가장 중요한 침습작용에 HGF을 매개로 하는 MMP와 u - PA의 활성도의 증가가 관여함을 알 수 있었다.

중심 단어 : 간세포성장인자 · c - Met · 하인두암 · 침습 · urokinase - type plasminogen activator · matrix metalloproteinase.

REFERENCES

1) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. *Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991;64:327-36.*
2) Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. *Type IV collagenases in invasive tumors. Breast Cancer Res Treat 1993;24:209-18.*
3) Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S. *Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. Cancer Res 1981;41:4629-36.*
4) Schmitt M, Janicke F, Graeff H. *Tumour-associated fibrinolysis: The prognostic relevance of plasminogen activators uPA and tPA in human breast cancer. Blood Coagul Fibrinolysis 1990;1:695-702.*
5) Slingerland J, Pagano M. *Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. J Cell Physiol 2000;183:10-7.*
6) Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W. *Scatter factor: Molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. J Cell Biol 1990;111:2097-108.*
7) Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, *et al. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:1937-41.*
8) Horie S, Aruga S, Kawamata H, Okui N, Kakizoe T, Kitamura T. *Biological role of HGF/MET pathway in renal cell carcinoma. J Urol 1999;161:990-7.*
9) Kawamata H, Uchida D, Hamano H, Kimura-Yanagawa T, Nakashiro KI, Hino S, *et al. Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: Correlation with lymph node metastasis. Int J Oncol 1998;13:699-704.*
10) Kim CH, Moon SK, Bae JH, Lee JH, Choi EC. *Effect of HGF in proliferation, dispersion and migration of hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Korean J Otolaryngol. In press.*
11) McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG. *Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)-mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. J Cell Physiol 1998;176:255-65.*
12) Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Ando M, Bertotti A, Comoglio PM, *et al. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. Faseb J 2000;14:1629-40.*
13) Ridley AJ, Comoglio PM, Hall A. *Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. Mol Cell Biol 1995;15:1110-22.*
14) Vadnais J, Nault G, Daher Z, Amraei M, Dodier Y, Nabi IR, *et al. Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. J Biol Chem 2002;277:48342-50.*
15) Jin SM, Lee SH, Choi G, Choi JO. *Expression of Matrix-Metalloproteinase-2, Urokinase-Type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor mode and lymph node metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma. Korean J Otolaryngol 1998;41:1169-73.*
16) Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, *et al. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. J Neurosurg 1994;81:69-77.*
17) Overall CM, Lopez-Otin C. *Strategies for MMP Inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. Nat Rev Cancer 2002;2:657-72.*
18) Rha SY. *Zymography. Biotechnology Transfer in Cencer Metastasis Research;2003. p.73-84.*
19) Folkman J. *Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. N Engl J Med 1971;285:1182-6.*
20) Dray TG, Hardin NJ, Sofferman RA. *Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:724-9.*
21) Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990;82:4-6.*
22) Grigioni WF, D'Errico A, Fortunato C, Fiorentino M, Mancini AM, Stetler-Stevenson WG, *et al. Prognosis of gastric carcinoma revealed by interactions between tumor cells and basement membrane. Mod Pathol 1994;7:220-5.*
23) Kim CN, Chung SM, Min JH, Kim SS, Kim MY. *An immunohistochemical study on the expression of matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and angiognesis in human laryngeal squamous cell carcinoma. Korean J Otolaryngol 1997;40:671-81.*